

# マンゴー (*Mangifera indica* L.) 種子の ラジカル消去活性物質の単離・同定

松坂 裕子

## Abstract

The non-edible parts of fruits were found to have high antioxidant activities. Among them, mango seeds showed higher antioxidant potential in DPPH radical scavenging assays. The DPPH radical scavenging abilities were highly correlated with their total polyphenol contents. In the present study, the main active constituents of mango seeds, as determined by HPLC, were pentagalloylglucose and methyl gallate. Both of these compounds showed high radical scavenging activity comparable to that of caffeic acid. Pentagalloylglucose and methyl gallate may, therefore, contribute to the antioxidant capacity of mango seeds in the ethyl acetate phase. The use of the mango seeds may, thus, serve as a significant source of antioxidants.

## 1. はじめに

近年、生体内においてフリーラジカルや活性酸素種が脂質過酸化などの酸化傷害を引き起し、さまざまな疾病や老化、発がんなどの要因となっていることが明らかにされてきた<sup>1-3)</sup>。それにつれ、これらの酸化傷害を抑制する抗酸化物質の重要性が認識され、特に食品に含まれる抗酸化物質による予防の重要性が注目されている<sup>4)</sup>。その中でも果実や野菜の健康機能に対する認知は日増しに向上し、それらを健康素材としてもっと効率よく利用するという動きもある。とりわけ、果物の搾汁残渣や流通させることの出来ない端物から機能性素材を取り出して活用するのは、環境面と健康面から好ましいといえる。

マンゴー (*Mangifera indica* L.) は、ウルシ科に属し、近年、輸入量が増加している果実のひとつである。北インドおよびマレー半島が原産地とされており、現在の主産地はインド、パキスタン、メキシコ、フィリピンなどである。インドでは約 4000 年前から栽培され、宗教的な聖木とされ、樹高は 10~20 m に達する<sup>5)</sup>。品種はきわめて多く、200~500 種あるとされるが、主産地の主要品種はインドでは、アルフォンソ、フィリピンではカラ

バオ、米国ではヘイデン、ケント、アーウィンなどが知られている。わが国には明治時代初頭に紹介され、80%は沖縄県で、そのほか鹿児島県、宮崎県、和歌山県などで栽培されている。一般に生食され、加工としては果肉を缶詰、乾燥食品、冷凍、ジュースとして利用する。原料の調製過程(果皮-除去-スライスなど)で生ずる廃棄部分(果皮、核、くず肉、搾汁かすなど)は果実全体の約 35%にのぼることから、これらの有効利用が課題となっている。著者は、マンゴー種子のポリフェノール含量および DPPH ラジカル消去活性が極めて高く、種子から抽出したポリフェノールが脂質の酸化を抑制することを報告した<sup>6)</sup>。そこで、本研究では、マンゴー種子のどの成分が高い抗酸化性に寄与しているかを明らかにすることを目的とし、マンゴー種子中からラジカル消去活性物質の単離・同定を行うことにした。

## 2. 実験方法

### 1) 実験材料

札幌市内で入手したフィリピン産のマンゴー(カラバオ種)の種子を用いた。

## 2) DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性の測定は福沢ら<sup>7)</sup>の方法に従った。すなわち、試料を添加したエタノール溶液 2 mL、0.1 M の酢酸緩衝液 (pH 5.5) 2 mL、0.5 mM の DPPH エタノール溶液 1 mL を混合した後、30 分間反応後、減少した DPPH 量を日立分光光度計 U-2001 型を用いて 517 nm の吸光度を測定した。試料溶液の代わりにエタノール溶液を加えたものをコントロールとして調製した。ラジカル消去活性 (%) の算出は次の式に従った。

DPPH ラジカル消去活性 (%) = 100 - (サンプルの吸光度 / コントロールの吸光度 × 100)

測定はいずれも 3 反復行い、その平均値を示した。

## 3) 薄層クロマトグラフィー (以下、TLC) 分析

TLC 分析は以下の条件で行った。

プレコート TLC 板: Silica gel 60 F 254 0.25 mm or 0.5 mm 厚 (Merck)

展開溶媒: クロロホルム: メタノール: ギ酸 = 12:5:1

スポットの検出には UV ランプ (254 nm or 365 nm) を使用し、呈色にはフェノール試薬法を用いた。

## 4) 高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC) 分析

HPLC 分析は以下の条件で行った。

カラム: Inertsil-PREP-ODS 6.0 × 250 mm

移動相: 20%CH<sub>3</sub>CN/0.1%formic acid

流速: 1.0 mL/min

検出: UV 254 nm

## 5) 質量分析 (以下、FAB-MS)

質量分析計は JEOL JMS-AX500 を用いて、高速原子衝撃 (fast atom bombardment、FAB) 法、ネガティブモードで測定した。

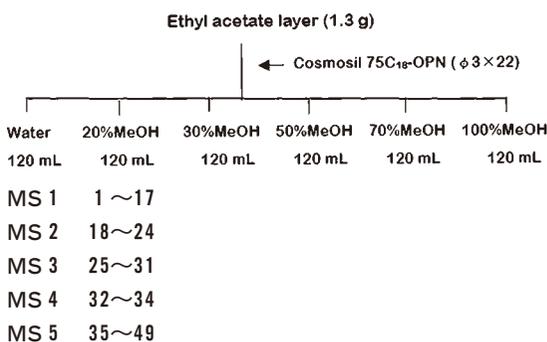
## 6) 抽出と分画

市販のマンゴー (カラバオ種) の種子 20 g を 5 倍量のメタノールで 2 回抽出した。抽出液のメタノールを減圧留去して得た抽出物 (2.6 g) に酢酸エチルと水を加え振盪することによって、酢酸エチル画分 (1.3 g) および水溶性画分 (1.3 g) を得た。DPPH ラジカル消去活性の高かった酢酸エチ

ル画分を分析した。

## 7) 酢酸エチル画分の活性物質の単離

マンゴー種子の酢酸エチル画分を水-メタノール系の逆相カラムクロマトグラフィー (Cosmosil 75 C<sub>18</sub>、φ 3 × 22 cm) に供した (Scheme 1)。Scheme 1 の溶媒系で 15 mL ずつ分画した後、TLC 分析の結果、Fr.1~17 をまとめて MS 1、Fr.18~24 をまとめて MS 2、Fr.25~31 をまとめて MS 3、Fr.32~34 をまとめて MS 4、Fr.35~49 をまとめて MS 5 とした。次に、この MS 1~5 の画分の DPPH ラジカル消去活性を測定した。高いラジカル消去活性を示した MS 2 画分 (水: メタノール = 7:3) と MS 4 画分 (水: メタノール = 1:1) を HPLC 分析に供した。



Scheme 1 Fractionation of ethyl acetate soluble parts obtained from mango seed extracts.

## 3. 結果と考察

### 1) 活性物質の単離・同定

マンゴー種子抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画後、高い DPPH ラジカル消去活性を示した MS 2 および MS 4 画分の分析を行った。初めに MS 2 画分を逆相 HPLC に供した。その結果、標準物質 (和光純薬製) との比較より、保持時間 9.6 分のピークを活性物質 (白色結晶 199 mg) として単離した (Fig. 1)。この単離化合物は質量分析 (FAB-MS) により、*m/z* 183 のイオンピークを示した (Fig. 2) 結果、分子量 184 の没食子酸メチル (methyl gallate) と同定した。

また、MS 4 画分より同様に保持時間 15.9 分の主ピークを活性物質 (紫色光沢結晶 400 mg) と

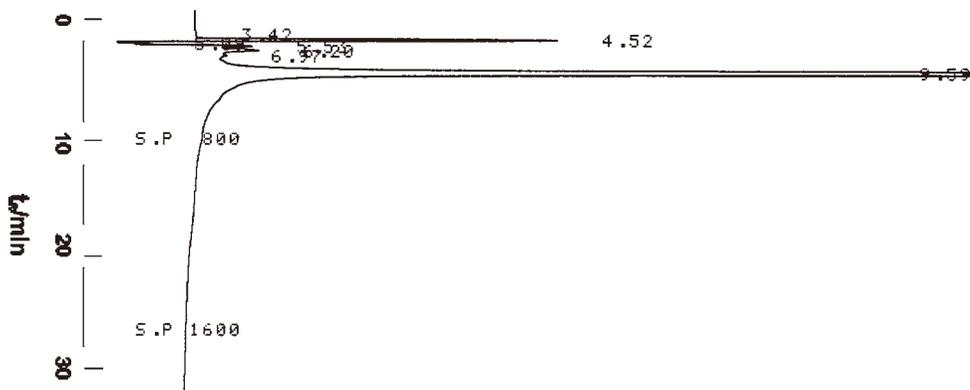


Fig. 1 HPLC profile of MS2.

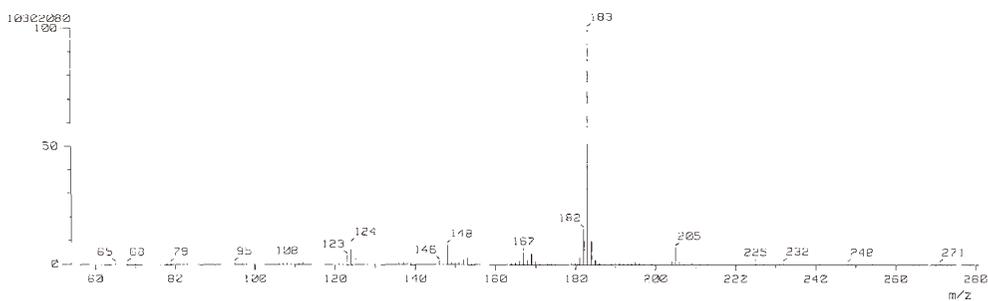


Fig. 2 FAB-mass (negative) spectrum of MS2.

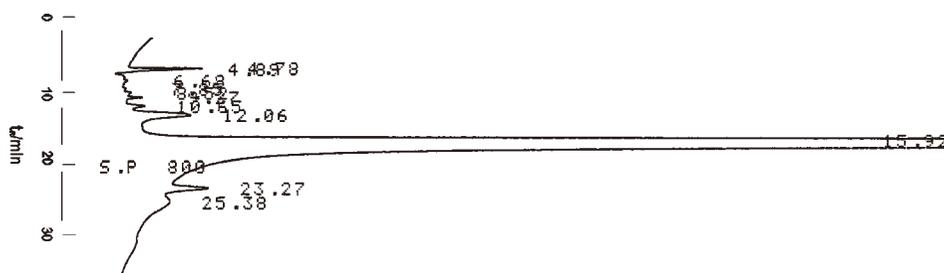


Fig. 3 HPLC profile of MS4

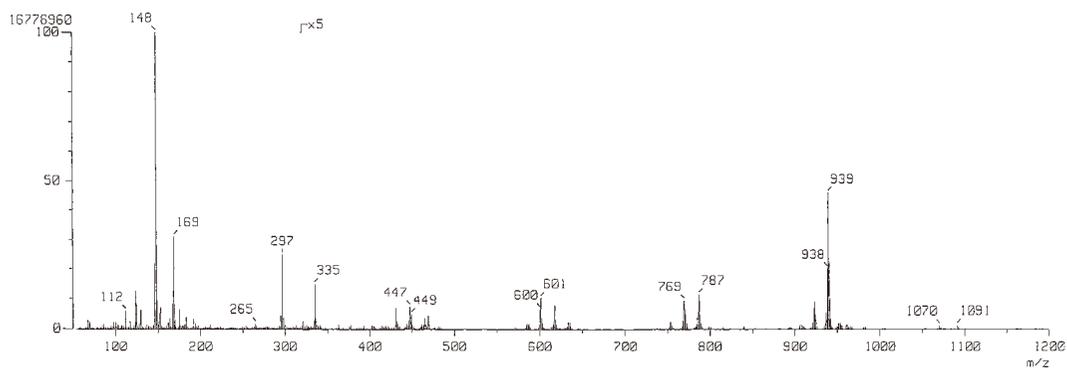


Fig. 4 FAB-mass (negative) spectrum of MS4

して単離した (Fig. 3)。この単離化合物は FAB-MS により、 $m/z$  939 のイオンピークを示した (Fig. 4) ので分子量 940 のペンタガロイルグルコース (pentagalloylglucose) と同定した。没食子酸メチル、ペンタガロイルグルコースは、マンゴー種子成分として既知の化合物であった。

## 2) DPPH ラジカル消去活性による抗酸化能

次に、単離した化合物の DPPH ラジカル消去活性試験の結果を Fig. 5 に示した。

マンゴー種子酢酸エチル画分より単離した没食子酸メチルおよびペンタガロイルグルコースはコーヒー酸よりも高い DPPH ラジカル消去活性を示した (Fig. 5)。また、これらの化合物はそれぞれ、199 mg、400 mg と含量も多いので (マンゴー種子生重当たりに換算すると、没食子酸メチル 1%、ペンタガロイルグルコース 2%)、マンゴー種子の抗酸化性に寄与していると考えられる。マンゴー種子の抗酸化性が高いとの報告<sup>8)</sup> はすでにあり、主要な活性物質として、没食子酸、エラグ酸、バニリン、およびタンニンが単離されている<sup>9-10)</sup>。また、Barreto ら<sup>11)</sup> は、マンゴー種子の主要な化合物はペンタガロイルグルコースで、次いで没食子酸メチルであると報告しており、今回の結果はこれと一致した。ペンタガロイルグルコースは、近年、病原性細菌の増殖抑制の報告<sup>12)</sup> がされている。このことから、従来、ほとんどが廃棄されているマンゴー種子に多量に含まれるペンタガ

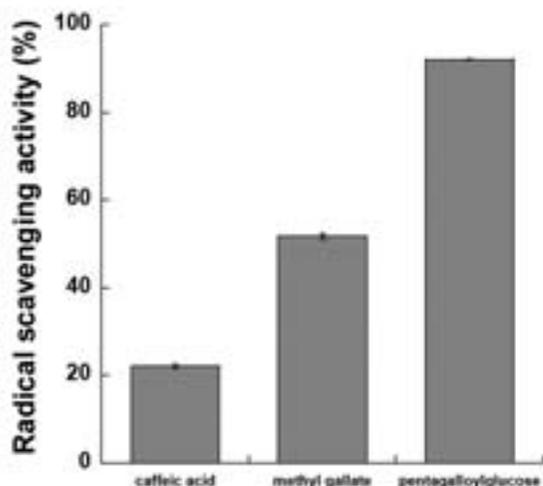


Fig. 5 DPPH radical activity of MS2 and MS4. Caffeic acid was used as a positive control. Concentration was adjusted to  $8\mu\text{M}$  each.

ロイルグルコースの有効利用が期待される。

## 4. 要約

他の果実に比べてポリフェノール含量および DPPH ラジカル消去活性が極めて高いマンゴー種子に含まれるラジカル消去活性物質の単離・同定を行った。

- 1) ウルシ科のマンゴー種子のメタノール抽出物の抗酸化性を DPPH ラジカル消去活性を指標に測定したところ、酢酸エチル可溶性画分に高いラジカル消去活性がみられた。酢酸エチル可溶性画分より、カラム分画、TLC 分析、逆相 HPLC により、活性物質として、没食子酸メチルおよびペンタガロイルグルコースを同定した。
- 2) 単離・同定した没食子酸メチルおよびペンタガロイルグルコースは、コーヒー酸よりも高い DPPH ラジカル消去活性を示し、マンゴー種子中の含量も多いので、マンゴー種子の抗酸化性に寄与していると考えられる。
- 3) 従来大部分が廃棄されているマンゴー種子の天然抗酸化剤としての有用性が示唆された。

## 5. 謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御助言を頂きました、北海道大学大学院農学研究院の川端潤教授に心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 松尾光芳, 嵯峨井勝, 吉川敏一訳, フリーラジカルと生体, 学会出版センター, pp.151-174 (1988).
- 2) 中村良, 川岸舜朗, 渡邊乾二, 大澤俊彦, 食品機能化学, 三共出版, pp.54-94 (1990).
- 3) 吉川敏一, 五十嵐脩, 糸川嘉則, フリーラジカルと疾病予防, 建帛社, pp.1-23 (1997).
- 4) 大澤俊彦, 天然抗酸化物質の探索とその応用, 化学と生物, **37**, 616-624 (1999).
- 5) 平 宏和 総監修, 食品図鑑, (女子栄養大学出版部) pp.276-277 (2006).
- 6) 松坂裕子, 熱帯産果実非可食部の抗酸化性とクッキーへの応用, 藤女子大学紀要 第 II 部, **48**, 97-101 (2011).
- 7) 福澤健治, 寺尾純二, 脂質過酸化実験法, (廣川書店, 東京) pp.79-80 (1990).
- 8) Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H.

- E., and El-Hamahmy, R. M., Egyptian mango by-product 2. Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chem.*, **103**, 1141-1152 (2007).
- 9) Soong, Y-Y., and Barlow, P. J., Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chem.*, **97**, 524-530 (2006).
- 10) Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., and El-Hamahmy R. M., Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. *Food Chem.*, **103**, 1134-1140 (2007).
- 11) Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., Brito, E. S., Pfundstein, B., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., and Owen, R. W., Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.) *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5599-5610 (2008).
- 12) Engels, C., Zhao, Y-Y., Gaenzle, M., Schieber, A., Knoedler, M., and Carle, R., Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7712-7718 (2009).